

(19)日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11)特許出願公開番号

特開平5-244958

(43)公開日 平成5年(1993)9月24日

(51)Int.Cl. <sup>5</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 N 15/56	Z N A	7236-4B		
1/21		8931-4B		
C 1 2 P 13/04				
// (C 1 2 N 15/56		8931-4B	C 1 2 N 15/ 00	A

審査請求 未請求 請求項の数3(全 5 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願平4-46836

(22)出願日 平成4年(1992)3月4日

(71)出願人 000000066

味の素株式会社

東京都中央区京橋1丁目15番1号

(72)発明者 土屋 誠

神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社中央研究所内

(72)発明者 三輪 清志

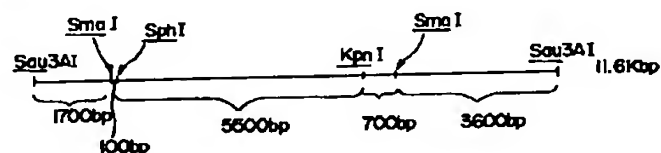
神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社中央研究所内

(54)【発明の名称】 コリネホルム細菌由来のシュークラゼ遺伝子

(57)【要約】

【目的】 コリネホルム細菌に由来しシュークラゼ活性を持つ蛋白質をコードする遺伝子を含むDNA断片を取得し、該DNA断片を含有するプラスミドをコリネホルム細菌に導入しシュークロースを取り込みグルコースとフラクトースに分解する活性すなわちシュークラゼ活性を増強する。

【構成】 コリネホルム細菌由来で、選択図に示す制限酵素切断部位を有する、シュークラゼ活性を持つ蛋白質をコードする遺伝子を含むDNA断片、該DNA断片を含有するコリネホルム細菌内で複製可能なプラスミド、および該プラスミドを保有するコリネホルム細菌



## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 コリネホルム細菌由来で、図1に示す制限酵素切断部位を有する、シュークラゼ活性を持つ蛋白質をコードする遺伝子を含むDNA断片。

【請求項2】 請求項1記載のDNA断片を含有するコリネホルム細菌内で複製可能なプラスミド。

【請求項3】 請求項2記載のプラスミドを保有するコリネホルム細菌。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、コリネホルム細菌に由来しシュークラゼ活性を持つ蛋白質をコードする遺伝子を含むDNA断片、該DNA断片を含有するコリネホルム細菌内で複製可能なプラスミド、および該プラスミドを保有するコリネホルム細菌に関するもので、アミノ酸などの発酵生産等に有効なコリネホルム細菌のシュークロース資化性改善、それによるアミノ酸収率およびアミノ酸生産性の向上に利用可能なものである。

## 【0002】

【従来の技術】 遺伝子操作技術を用いたアミノ酸生産菌の育種については従来より多くの研究がなされており、報告例も多数ある (Biotechnology Letters, Vol. 2 (1980) pp. 525-530, Appl. Environ. Microbiol., Vol. 144 (1979) pp. 181-190, 日本農芸化学会昭和56年度大会講演要旨集 (1981) pp. 8)。しかしこれらはすべてアミノ酸生成系の遺伝子を材料とし、それらを増強することによって目的とするアミノ酸の菌体あたりの生産性を高めるものであって、それらの出発物質となる糖の資化性を高めることによって生産効率を高めるものではなかった。

【0003】 遺伝子操作技術を用いてアミノ酸生産菌の糖の資化性を高める報告例としては、特開昭61-119185、特開平2-171178がある。これらの技術は、遺伝子操作によりエシェリヒア・コリにシュークロース資化能を与えている。すなわち、シュークロースを取り込み、それをグルコースとフラクトースに分解する活性をエシェリヒア・コリに与え、本来エシェリヒア・コリが資化できないシュークロースを炭素源として利用できるようにしたというものである。しかし、コリネホルム細菌においては、遺伝子操作技術を用いてシュークロースなど糖の資化性を高めたという報告はなかった。

## 【0004】

【発明が解決しようとする課題】 従って本発明の目的は、遺伝子工学の手法を用いてコリネホルム細菌のシュークロース資化性を改善することであり、これによりアミノ酸発酵におけるアミノ酸の収率の向上をはかることである。さらにはシュークロース資化性が高まることに起因する菌の生育速度改善効果を利用したアミノ酸の生産性の向上を実現することである。具体的には、コリネホルム細菌に由来しシュークラゼ活性を持つ蛋白質を

コードする遺伝子を含むDNA断片、および該DNA断片を含有するコリネホルム細菌内で複製可能なプラスミドを取得し、該プラスミドをコリネホルム細菌に導入し、該細菌のシュークロースを取り込みグルコースとフラクトースに分解する活性を増強することである。

## 【0005】

【課題を解決するための手段】 本発明者等は上記課題を解決するために鋭意検討を重ねた結果、遺伝子工学の手法を用いてコリネホルム細菌由来のシュークラゼ活性を持つ蛋白質をコードする遺伝子を取得することに成功した。

【0006】 即ち、本発明は、コリネホルム細菌由来で、図1に示す制限酵素切断部位を有する、シュークラゼ活性を持つ蛋白質をコードする遺伝子を含むDNA断片、該DNA断片を含有するコリネホルム細菌内で複製可能なプラスミド、および該プラスミドを保有するコリネホルム細菌である。

【0007】 本発明におけるコリネホルム細菌とはバージェイズ・マニュアル・オブ・ディターミネーティブ・バクテリオロジー第8版599ページ (1974) に記載されているように好気性のグラム陽性細菌である。

【0008】 本発明におけるシュークラゼ活性を持つ蛋白質をコードする遺伝子とは、シュークロースよりグルコースとフラクトースを生成する活性を持つ蛋白質をコードする遺伝子のことをさす。シュークラゼ活性は菌体がシュークロースを炭素源として利用する時に重要であって、菌体は分解されたグルコースを利用する。

【0009】 本発明においてシュークラゼ活性を持つ蛋白質をコードする遺伝子を含むDNA断片の取得方法は、コリネホルム細菌の染色体DNAより遺伝子ライブラリーを作成し、プローブを用いてシュークラゼ遺伝子のクローニングを行う方法が採用できる。以下、詳細に説明する。

【0010】 まず、コリネホルム細菌から得られたDNA数百マイクログラムを制限酵素Sau3AIで部分分解し、シュークロース密度勾配遠心によって、分子量約千から1万程度の分画を取得する。これをエシェリヒア・コリのベクターpUC18を制限酵素BamHIで切断しておいたものと混合し、ATP存在下、T4DNAライゲースによって連結後、エシェリヒア・コリ JM109株を形質転換することによって、コリネホルム細菌全遺伝子のライブラリーを作成する。

【0011】 シュークラゼ遺伝子は パチルス・ズブチリス (Gene, Vol. 45 (1986) pp. 221-225)、バクテロイデス・フラジリス (Appl. Environ. Microbiol., Vol. 56 (1990) pp. 1944-1948)、ザイモモナス・モビリス (J. Bacteriol., Vol. 172 (1990) pp. 6727-6735)、ストレプトコッカス・ミュータンス (Infect. Immun., Vol. 56 (1988) pp. 1956-1960)、サッカロミセス属酵母 (Nucleic Acids Res., Vol. 11 (1983) pp. 1943-195

4)、ピブリオ・アルジノリティカス (Gene Vol. 80 (1989) pp. 49-56)などでクローニングされており、それらの遺伝子の塩基配列はある程度の相同性を持っている (J. Bacteriol., Vol. 172 (1990) pp. 6727-6735)。各生物間で高く保存されている箇所の配列をもとに数種類の合成DNAをDNAシンセサイザーを用いて合成する。

【0012】このようにして作成した数種の合成DNAを(<sup>32</sup>P)ATPを基質としてリン酸化し、標識プローブとする。上記にて作成した遺伝子ライブラリーを用いて、コロニーハイブリダイゼーションを行い、該プローブにハイブリダイズするコロニーのスクリーニングを行う。プローブとハイブリダイズするコロニーのうち、その中でシュークラゼ活性を発現するものを選び出す。

【0013】本発明において、シュークラゼ活性を持つ蛋白質をコードする遺伝子を乗せるプラスミドとしては特に制限はないが、通常コリネホルム細菌由来のプラスミドを用いれば良い。具体的にはpHM1519 (Agric. Biol. Chem., Vol. 48 (1984) pp. 2901-2903)、pAM330 (Agric. Biol. Chem., Vol. 48 (1984) pp. 2901-2903)、およびこれらをベースとした薬剤耐性プラスミド等である。また、ホモログスリコンビネーションを用いて染色体中に導入することも可能である。

【0014】本発明において宿主菌として使用できるコリネホルム細菌としては、例えばプレビバクテリウム・サッカロリチクムATCC14066、プレビバクテリウム・インマリオフィルムATCC14068、プレビバクテリウム・ラクトファーメンタムATCC13869、プレビバクテリウム・ロゼウムATCC13825、プレビバクテリウム・フラバムATCC13826、コリネバクテリウム・アセトアシドフィルムATCC13870、コリネバクテリウム・グルタミクムATCC13032、13060、コリネバクテリウム・リリウムATCC15990、等の野生株、および上記グルタミン酸生産菌より誘導され、グルタミン酸生産性を失った変異株、更にはリジンをはじめとするアミノ酸類、イノシンをはじめとする核酸類等、他の生産物を生産する変異株も含まれる。

【0015】シュークラゼ活性を持つ蛋白質をコードする遺伝子を有する組換えプラスミドを上述したコリネホルム細菌に導入する方法としては通常よく用いられるプロトプラスト法 (Gene, Vol. 39 (1985) pp. 281-286)、エレクトロポレーション法 (Bio/Technology, Vol. 7 (1989) pp. 1067-1070)、等の方法を用いれば良い。また得られた形質転換体は通常よく用いられている方法、条件に従って培養すればよい。

【0016】シュークラゼ活性を持つ蛋白質をコードする遺伝子が導入されたコリネホルム細菌を用いて生産効率を上げることのできる有用物質としては、各種アミノ酸の他、インターロイキン2、6等の生理活性物質でもよい。該有用物質は、形質転換体を培養することにより菌体内または菌体外に蓄積される。

#### 【0017】

【実施例】以下に本発明を実施例に基づいて具体的に説明する。

【0018】(遺伝子ライブラリーの作成) プレビバクテリウム属細菌およびプレビバクテリウム・フラバムより、Saito-Miuraの方法 (Biochim. Biophys. Acta, Vol. 8278 (1963) pp. 619-629)によって染色体DNAを調製した。調製したDNA約100 $\mu$ gを10%から40%のシュークロース・デンシティー・グラディエント・チューブに重層し220,000r. p. m.、22時間、20℃の条件下で超遠心分離を行った。チューブの下に針で穴をあけ、1mlずつフラクショネーションし、約1,500から6,000bpの画分を採取した。これをTEバッファー (10mM Tris, 1mM EDTA, pH 8.0) に対し透析を行い、BamHIで切断したベクターpUC18とT4DNAリガーゼを用いて連結した。この溶液とエシェリヒア・コリ JM109株を混合して該株の形質転換を行った。その結果、約10,000クローンを持つ遺伝子ライブラリーを作成した。

【0019】(プローブの作成) 既に塩基配列の決定されているシュークラゼ ( $\beta$ -フルクトシダーゼ) 遺伝子には以下のものがある。パチルス・ズブチリス由来レバンシュークラゼ、レバナーゼ、およびシュークラゼ (Gene, Vol. 45 (1986) pp. 221-225)、バクテロイデス・フラジリス (Appl. Environ. Microbiol., Vol. 56 (1990) pp. 1944-1948)、ザイモナス・モビリス (J. Bacteriol., Vol. 172 (1990) pp. 6727-6735)、ストレプトコッカス・ミュータンス由来シュークラゼ (Infect. Immun., Vol. 56 (1988) pp. 1956-1960)、サッカロミセス・セレビジェ由来インベルターゼ (Nucleic Acids Res., Vol. 11 (1983) pp. 1943-1954)、ピブリオ・アルジノリティカス由来シュークラゼ (Gene Vol. 80 (1989) pp. 49-56)。これらの遺伝子の塩基配列には相互に相同性のある部分があり (J. Bacteriol., Vol. 172 (1990) pp. 6727-6735)、この情報をもとに配列表の配列番号1、2、3記載の配列を持つ合成DNAをDNAシンセサイザーを用いて合成し、プローブに供した。

【0020】(ハイブリダイゼーション) 作成した遺伝子ライブラリーに対し上記プローブを用いてコロニーハイブリダイゼーションを行った。方法はDerek Woodsの方法 (FOCUS, Vol. 6 (1984) pp. 1-4)に従った。ハイブリダイゼーションの温度は50℃、洗浄は48℃で行った。各プローブと反応するクローンそれぞれをM9増地 (Molecular Cloning second edition, Cold Spring Harbor Press (1989) Maniatis et. al. pp. A.3) 100mlに培養した。集菌した菌体を0.9% 生理食塩水で洗浄した後、5mlの0.1Mリン酸ナトリウムバッファーに懸濁し、超音波で菌体を破碎した。33,000rpm、1時間遠心し、上澄を取ってクルード・イクストラクトとした。このクルード・イクストラクト150 $\mu$ lと0.5M シュークロース水溶液50 $\mu$ lとを混合し、30℃、1時間反応させた後、100℃、3分加

熟して酵素を失活させた。生成したグルコースをグルコースCテストワコー（和光純薬工業株式会社製）を用いて検出し、シュークラゼ活性を測定した。配列表の配列番号2に示したプローブによって検出されたクローンの中の1つの株が明瞭なシュークラゼ活性を示した

（表1）。表1には、1mg蛋白質あたりのシュークラゼ活性（比活性）を示してある。シュークラゼ活性を示すこの株の持つプラスミドをpBS3-43と命名した。

#### 【0021】

#### 【表1】

プラスミド／宿主                      シュークラゼ活性  
(unit/ml protein)

pUC18/JM109	0
pBS3-43/JM109	3.1

【0022】（クローンの解析）得られたクローンから、プラスミドを調製し、挿入されたDNA断片(11.6kb)について制限酵素地図を作成した（図1）。さらに挿入DNAの内6300bpのSmaI断片を切り出し、エシェリヒア・コリとコリネホルム細菌のシャトルベクターであるpSAC4のSmaIサイトに導入したところ、このプラスミド

配列

GGGCTGTAA ATGACCCAAA TGGG

配列番号：2

配列の長さ：24

配列の型：核酸

配列

TACATGTGGG AATGCCCTGA TTG

配列番号：3

配列の長さ：33

配列の型：核酸

配列

ACA GATCAAGGTT TTGATTTTAA CGCGCCGCAA 33

\*（pSSM30）はエシェリヒア・コリ中でシュークラゼ活性を発現することができた。また、プラスミドpSSM30を保有するエシェリヒア・コリJM109(AJ12678)は、微工研に寄託されており、受託番号FERM P-12821が付与されている。

#### 【0023】

【発明の効果】コリネホルム細菌に由来しシュークラゼ活性を持つ蛋白質をコードする遺伝子を含むDNA断片、および該DNA断片を含有するコリネホルム細菌内で複製可能なプラスミドを取得し、該プラスミドをコリネホルム細菌に導入し、該細菌のシュークロースを取り込みグルコースとフラクトースに分解する活性を増強する。

#### 【図面の簡単な説明】

【図1】プラスミドpBS3-43に挿入されたDNA断片の制限酵素地図。

#### 【配列表】

配列番号：1

配列の長さ：24

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

24

※鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

※配列の種類：他の核酸 合成DNA

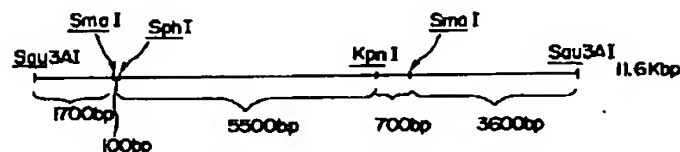
24

★鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

★配列の種類：他の核酸 合成DNA

【図1】



## 【手続補正書】

【提出日】平成4年3月6日

## 【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0020

【補正方法】変更

## 【補正内容】

【0020】（ハイブリダイゼーション）作成した遺伝子ライブラリーに対し上記プローブを用いてコロニーハイブリダイゼーションを行った。方法はDerek Woodsの方法(FOCUS, Vol. 6 (1984) pp. 1-4)に従った。ハイブリダイゼーションの温度は50℃、洗浄は48℃で行った。各プローブと反応するクローンそれぞれをM9培地(Molecular Cloning second edition, Cold Spring Harbor Press (1989) Maniatis et. al. pp. A.3) 100mlに培養した。集菌した菌体を0.9% 生理食塩水で洗浄した後、5mlの0.1Mリン酸ナトリウムバッファーに懸濁し、超音波で菌体を破碎した。33,000rpm、1時間遠心し、上澄を取ってクルード・イクストラクトとした。このクルード・イクストラクト150μlと0.5M シュークロース水溶液50μlとを混合し、30℃、1時間反応させた後、100℃、3分加熱して酵素を失活させた。生成したグルコースをグルコースCテストワコー（和光純薬工業株式会社製）を用い

て検出し、シュークラゼ活性を測定した。配列表の配列番号2に示したプローブによって検出されたクローンの中の1つの株が明瞭なシュークラゼ活性を示した

（表1）。表1には、1mg蛋白質あたりのシュークラゼ活性（比活性）を示してある。シュークラゼ活性を示すこの株の持つプラスミドをpBS3-43と命名した。また、プラスミドpBS3-43を保有するエシェリヒア・コリJ M109(AJ12678)は、微工研に寄託されており、受託番号FERM P-12821が付与されている。

## 【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0022

【補正方法】変更

## 【補正内容】

【0022】（クローンの解析）得られたクローンから、プラスミドを調製し、挿入されたDNA断片(11.6kb)について制限酵素地図を作成した（図1）。さらに挿入DNAの内6300bpのSmaI断片を切り出し、エシェリヒア・コリとコリネホルム細菌のシャトルベクターであるpSAC4のSmaIサイトに導入したところ、このプラスミド（pSSM30）はエシェリヒア・コリ中でシュークラゼ活性を発現することができた。

フロントページの続き

(51)Int.Cl.<sup>5</sup>

識別記号

庁内整理番号

FI

技術表示箇所

C12R 1:13)

(C12N 15/56

C12R 1:15)

(C12N 1/21

C12R 1:15)

(C12P 13/04

C12R 1:15)